

DOI:10.13350/j.cjpb.221105

• 论著 •

骨折相关感染 5 种常见病原菌的多重 qPCR 体系建立及应用*

李启丹^{1,2}, 罗刚^{1,3}, 马显志^{1**}

(1. 青海省人民医院骨科, 青海西宁 810007; 2. 青海大学医学院基础医学部; 3. 青海大学生态环境工程学院)

【摘要】 目的 建立一种快速检测骨折相关感染(fracture-related infection, FRI)的方法。方法 利用 5 种临床常见致病菌(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、阴沟杆菌)的特异 DNA 序列,设计特异的引物和探针,建立 FRI 常见致病菌的多重 qPCR 检测方法。结果 建立的多重 qPCR 方法具有较好的特异性,其检测循环阈值(Cycle threshold, Ct)与各质粒 DNA 浓度有良好的线性关系。且多重 qPCR(AUC=0.73; 95% CI, 0.46-0.80)的检测性可与组织培养法(AUC=0.88; 95% CI, 0.67-0.96)结果相符,检测时间<5 h。结论 该 FRI 检测方法诊断快速、敏感,结果稳定,可应用于 FRI 的多种细菌感染检测。

【关键词】 骨折相关感染(FRI); 多重 qPCR; 分子检测

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1261-07

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov.; 17(11):1261-1267.]

Establishment of multiplex qPCR system for common pathogens and its application in the detection of fracture related infection

LI Qi-dan^{1,2}, LUO Gang^{1,3}, MA Xian-zhi¹ (1. Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining, 810007; 2. Department of Basic Medical sciences, Medical College of Qinghai University; 3. College of Eco-environmental Engineering, Qinghai University)

【Abstract】 **Objective** A multiplex PCR system was established to rapidly detect pathogenic bacteria for fracture-related infection (FRI). **Methods** Specific primers and probes were designed using specific DNA sequences of 5 five common pathogenic strains (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*) for this multiple PCR assay. **Results** The established multiplex qPCR method had better specificity and the value of cycle threshold (CT) of this method had a linear relationship with the concentration of each DNA template. The performance of multiplex qPCR (AUC=0.73; 95% CI, 0.46-0.80) is comparable to the tissue culture (AUC=0.88; 95% CI, 0.67-0.96), while multiplex qPCR can obtain the result in 5 hours. **Conclusion** Compared with the traditional bacterial culture and biochemical identification, multiplex qPCR test make an effective and accurate pathogenic detection in FRI and substantially shorten the identification time. It is more advantageous in the detection of multiple bacterial infections and can be applied to the initial test of FRI.

【Key words】 Fracture-related infection (FRI); Multiplex qPCR; Molecular detection

*** 骨折相关感染(fracture-related infection, FRI)是创伤外科术后常见的并发症^[1]。闭合性骨折术后感染率为 1%~2%^[2],而开放性骨折术后感染率为 15%~55%^[3],造成创伤中晚期病死率的 70%以上^[4]。且 FRI 的复发率较高,治疗周期长,甚至有致残、截肢和死亡的风险^[5]。及时准确查明骨折感染病原菌的种类是 FRI 药物治疗的关键^[6-7],对 FRI 患者的预后也具有重要意义。目前 FRI 的治疗仍以应用敏感型抗生素为主。抗生素治疗前提在于需尽快确定致病菌,并对药物进行合理调整^[8-9],以减少细菌耐药性的产生,改善患者治疗效果。FRI 主要由细菌感染造成,其中革兰阳性菌感染率最高的是金黄葡萄球菌(42.0%)和表皮葡萄球菌(9.9%)^[10];革兰阴性菌感染率由高到

低分别为大肠埃希菌(28.9%)、铜绿假单胞菌(12.4%)和阴沟肠杆菌(4.0%)^[10]。青海省人民医院临床观察以上所述 5 种细菌造成近 80%的骨折相关感染。本研究拟以 5 种 FRI 常见致病菌为实验对象,建立一种快速检测骨折相关感染致病菌的方法。

目前临床识别病原体较常见的方法是组织培养。随着医学分子生物学的发展,荧光定量 PCR 技术被应

* **【基金项目】** 青海省科学技术厅面上项目(No. 2019-ZJ-927)。

** **【通讯作者】** 马显志, E-mail: 870248900@qq.com

【作者简介】 李启丹(1997-),女,青海西宁市人,硕士研究生,医学生理学与生物化学专业,主要研究方向:分子生物学。E-mail: liqdazj@163.com

用于骨相关感染的诊断和检测^[11-12],基于 TaqMan 探针的实时荧光 PCR 检测具有定量准确、快速、简便、直观的优势,在病原菌检测中得到广泛的应用^[13-14]。目前该技术在骨科领域中的应用主要局限于髌膝关节感染^[15-17]。本研究基于 5 种 FRI 常见病原菌(金黄葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌)的特异序列,分别设计引物和 TaqMan 探针,在此基础上建立 FRI 常见病原菌 qPCR 检测方法。旨在为 FRI 快速检测致病菌提供理论依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 实验菌株 大肠埃希菌 K12(ATCC25922)来自本实验室保留菌株,本研究所用其他四种菌株均购自中国科学院微生物菌种保藏中心,菌株信息见表 1。

表 1 菌株信息
Table 1 Strain Information

名称 Name	来源 Sources	菌株号 Strain No.	培养温度 (°C) Temp
铜绿假单胞菌 ^a	CGMCC	1.12483	37
金黄色葡萄球菌金黄亚种 ^b	CGMCC	1.2465	37
表皮葡萄球菌 ^b	CGMCC	1.4260	37
阴沟肠杆菌 ^b	CGMCC	1.2022	37

a:培养基成分包括蛋白胨 10.0 g,酵母粉 5.0 g,NaCl 10.0 g,琼脂粉 15.0 g,蒸馏水 1.0 L。b:培养基成分包括蛋白胨 5.0 g,营养肉汤 3.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂粉 15.0 g,蒸馏水 1.0 L。

表 2 多重 qPCR 引物及探针序列

Table 2 Nucleotide sequences of primers and probes for multiplex qPCR

检测菌株 Strains	特异性片段/长度(bp) Specific fragment/Length(bp)	引物名称 Primers	引物序列 Sequence of primers
金黄色葡萄球菌	Nuc/166bp	SA-F	CCTGAAGCAAGTGCATTTACGA
		SA-R	CTTTAGCCAAGCCTTGACGAACT
		SA-P	FAM-CATCAGCATAAAATATACGCTAAGCCACGTCCA-BHQ1
		SE-F	GCATGCTGCAATAAAAAAATCGT
表皮葡萄球菌	16S 基因/179bp	SE-R	CCGGAAGTGTTTCCAATGGA
		SE-P	HEX-CGAGGATTAATGCATGATGCTGAC-BQH1
		K12-F	GCCTCGCCTGGAGAATGA
大肠埃希菌	ECs104/272bp	K12-R	CCTGAGACTGCGTGGAA
		K12-P	CY5-CGCGAAACGCGCTTCACTACCGCAA-BHQ2
		PA-F	TCACCACTCTGCAATCCAGTTC
铜绿假单胞菌	外毒素 A 基因/151bp	PA-R	GTGAAGGATGAGGCTGATCGA
		PA-P	FAM-CCATAAAGCCCTCTTCCGCTCC-BQH1
		EC-F	CRAGCATCTACGGTGTGTAGGTG
阴沟杆菌	OmpX/196bp	EC-R	CCRTAGTCGCTGTTGCTTGC
		EC-P	HEX-CGACAGAGGGCGAGAATCTGCTGC-BQH1

注:F:Forward primer,上游引物;R:Reverse primer,下游引物;P:Probe,探针。

2.2 5 种菌株标准质粒的构建 以各菌种基因组 DNA 作为模板,进行 PCR 获得各菌种特异性目的片段,引物序列见表 2。PCR 体系(50 μL):2×HiFi PCR SuperMix(含 Taq 酶和 dNTP)25 μL,上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μL,ddH₂O 补至 50 μL。PCR 反应条件:95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30

1.2 主要试剂 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;营养肉汤购于北京陆桥生物技术有限责任公司;Primer Ex TaqTM(Probe qPCR)购于宝生物工程大连有限公司;氨苄青霉素、感受态细胞 DH5α、2×HiFi PCR SuperMix 购于北京全式金生物技术有限公司;M5 Hiper pToPo-TA 载体购于北京聚合美生物科技有限公司。

LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪购于德国 Roche Diagnostics 公司;DYY-10C 型电泳仪购于北京市六一仪器厂;低温台式离心机购于德国 Eppendorf 公司;凝胶成像分析系统(Biorad)购于美国 BIO-RAD 公司。

2 方 法

2.1 引物及探针的设计 根据 GenBank 中 5 种致病菌特异基因的 DNA 序列,用 Primer express 3.0 各设计一对特异性引物和一个 TaqMan 探针(表 2)。选择 FAM 作为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌探针的报告发光基团,HEX 作为表皮葡萄球菌、阴沟肠杆菌探针的报告发光基团,CY5 作为大肠埃希菌探针的报告发光基团。引物和探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。

s,共 30 个循环;反应前 95 °C 预变性 5 min;反应结束 72 °C 保持 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收 PCR 产物。

胶回收产物连接至 TOPO 载体,连接产物转化至感受态细胞 DH5α 中,阳性菌落由上海生工生物工程技术有限公司测序,保存测序正确的克隆作为含

有标准质粒的菌株。

2.3 质粒的提取 将含有正确质粒的菌液接种于含氨苄青霉素的LB培养液,摇床37℃,200 r/min振荡培养过夜。提取质粒,PCR验证,-20℃保存备用。

2.4 多重qPCR反应体系、反应条件 多重qPCR扩增反应体系(20 μL),2×Primer Ex Taq 10 μL,5 μmol/L Primer/probe Mix 1 μL,Plasmid DNA 1 μL,ddH₂O补至20 μL。多重qPCR反应条件为:95℃预变性3 min,95℃变性15 s,60℃退火和延伸30 s,共40个循环。

2.5 特异性检测 以金黄色葡萄球菌标准质粒为阳性对照,其他4种菌的标准质粒作为阴性对照,ddH₂O为无模板对照进行特异性验证,反应体系及反应条件同上述多重qPCR。同理,其余4种菌以其标准质粒为阳性对照,其他菌的标准质粒为阴性对照,ddH₂O为无模板对照,验证多重qPCR检测方法的特异性。

2.6 敏感性检测 为评价多重qPCR检测方法的敏感性,对构建的各标准质粒DNA进行10倍比梯度稀释,形成浓度为1×10⁻¹ ng/μL、1×10⁻² ng/μL、1×10⁻³ ng/μL、1×10⁻⁴ ng/μL、1×10⁻⁵ ng/μL、1×10⁻⁶ ng/μL的DNA溶液。按照多重qPCR反应体系及反应条件进行PCR扩增,检测该方法的敏感性。

2.7 临床样品应用 本研究共收集了90名受试者的备留组织样本,其中66例为FRI患者,24例为阴性对照组。且骨折类型均为开放性骨折。用液氮将组织研磨成细粉状,按照基因组DNA提取试剂盒提取其DNA。利用上述多重qPCR方法进行感染致病菌检测,并将多重qPCR方法结果与组织培养法进行比较分析。本研究收集的临床样本得到了青海省人民医院伦理委员会的批准(编号:2020-73),且所有患者都签署了知情同意书。

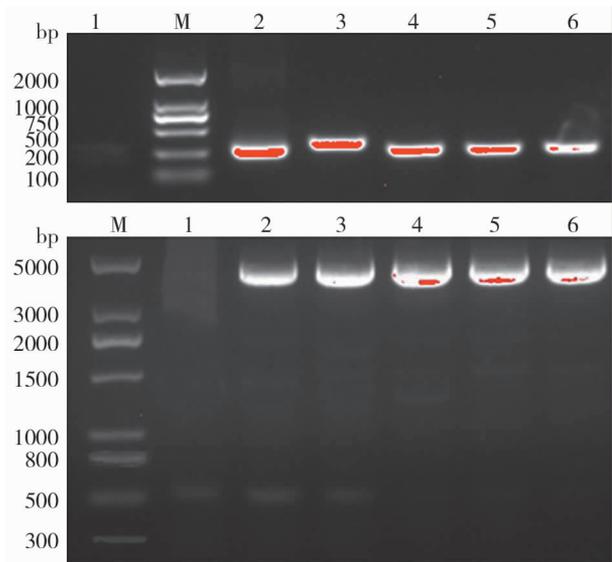
2.8 统计学分析 统计学分析使用SPSS 19.0软件t检验方法。所有的数据均使用3.7.6版本R软件包(R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)进行分析。使用Shapiro-Wilk检验对连续变量的正态分布进行检查,并以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用R软件包中的pROC,计算了95%置信区间、敏感性、特异性、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)和ROC曲线下面积(AUC)。

结果

1 阳性质粒鉴定结果

将含有金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和阴沟杆菌特异DNA序列的重组质粒进行常规PCR检测,目的片段大小均为预期大小

(图1A)。将质粒测序结果通过BLAST与GenBank中相应序列进行对比,同源性达99%,且质粒电泳图结果显示5种菌的大小与预期相符(图1B),表明标准质粒构建成功。



A M DNA标准DL 2000 1 阴性对照 2~6 分别为 *E. cloacae* (196 bp)、*E. coli* (272 bp)、*P. aeruginosa* (151 bp)、*S. aureus* (166 bp)、*S. epidermidis* (179 bp) 阳性质粒常规PCR产物 B M DNA标准DL 5000 1 阴性对照 2~6 分别为 *E. cloacae* (4 322 bp)、*E. coli* (4 398 bp)、*P. aeruginosa* (4 277 bp)、*S. aureus* (4 292 bp)、*S. epidermidis* (4 305 bp) 阳性质粒琼脂糖凝胶电泳结果。

图1 五种致病细菌阳性质粒常规PCR鉴定

A M DNA Marker DL 2000 1 Negative control 2-6 PCR product of plasmid with DNA from *E. cloacae* (196 bp), *E. coli* (272 bp), *P. aeruginosa* (151 bp), *S. aureus* (166 bp) and *S. epidermidis* (179 bp) B M DNA Marker DL 2000 1 Negative control 2-6 Plasmids with DNA from *E. cloacae* (4 322 bp), *E. coli* (4 398 bp), *P. aeruginosa* (4 277 bp), *S. aureus* (4 292 bp) and *S. epidermidis* (4 305 bp).

Fig. 1 PCR identification of five pathogenic bacteria positive plasmids

2 特异性检测结果

以某一种菌的标准质粒为阳性对照,其他4种菌标准质粒为阴性对照,ddH₂O为无模板对照,验证多重qPCR检测方法的特异性。特异性实验结果显示于图2。在各自荧光标记的探针通道下只有携带相应病原菌片段的质粒出现了扩增曲线,其它菌则无扩增曲线出现(图2),说明该检测方法的特异性足够强。平行实验结果显示组内差异与组间差异的CV(Coefficient of Variation,变异系数)值均<0.5,说明该方法重复性较好(表3)。

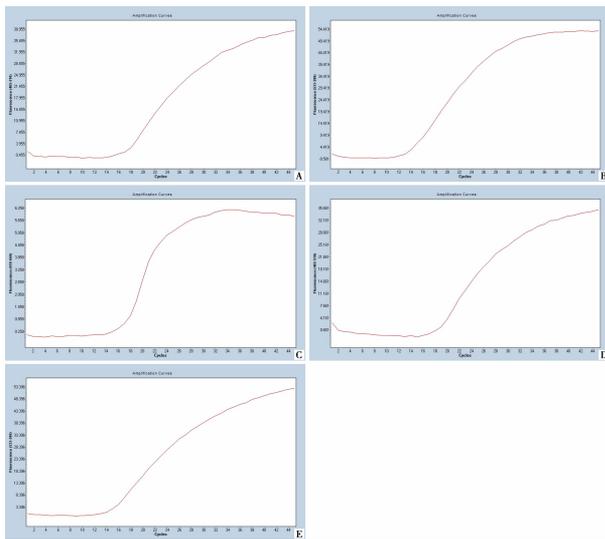
3 敏感性检测结果

对各标准质粒DNA进行10倍比梯度稀释,形成浓度为1×10⁻¹ ng/μL、1×10⁻² ng/μL、1×10⁻³ ng/μL、1×10⁻⁴ ng/μL、1×10⁻⁵ ng/μL、1×10⁻⁶ ng/μL的DNA溶液。多重qPCR敏感性实验结果显示,该方法的最低检测浓度为1×10⁻⁶ ng/μL(图3)。根据倍比稀释DNA的Ct值(循环阈值)及拷贝数的对数绘制标准曲

线,标准曲线的横坐标为起始拷贝数的对数,纵坐标为Ct值,得到检测阈值与5种菌特异DNA拷贝数的标准曲线(图4)。各检测DNA浓度与多重qPCR的Ct值之间存在有良好的线性关系,其相关系数、斜率、截距等参数见表4。

表3 五种致病菌多重qPCR重复性结果
Table 3 Repeatability results of multiplex qPCR for five pathogenic bacteria

项目 (Groups)	C (Mean±S. D)	CV (%)
金黄色葡萄球菌(<i>S. aureus</i>)组内	19.59±0.39	0.02
金黄色葡萄球菌(<i>S. aureus</i>)组间	21.98±2.54	0.12
表皮葡萄球菌(<i>S. epidermidis</i>)组内	16.57±0.06	0.01
表皮葡萄球菌(<i>S. epidermidis</i>)组间	17.42±3.61	0.21
大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)组内	10.44±0.09	0.01
大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)组间	18.93±7.50	0.40
铜绿假单胞菌(<i>P. aeruginosa</i>)组内	17.21±0.08	0.01
铜绿假单胞菌(<i>P. aeruginosa</i>)组间	15.89±4.36	0.27
阴沟杆菌(<i>E. cloacae</i>)组内	21.37±0.13	0.01
阴沟杆菌(<i>E. cloacae</i>)组间	18.58±7.17	0.39



A 铜绿假单胞菌 B 阴沟杆菌 C 大肠埃希菌 D 金黄色葡萄球菌 E 表皮葡萄球菌

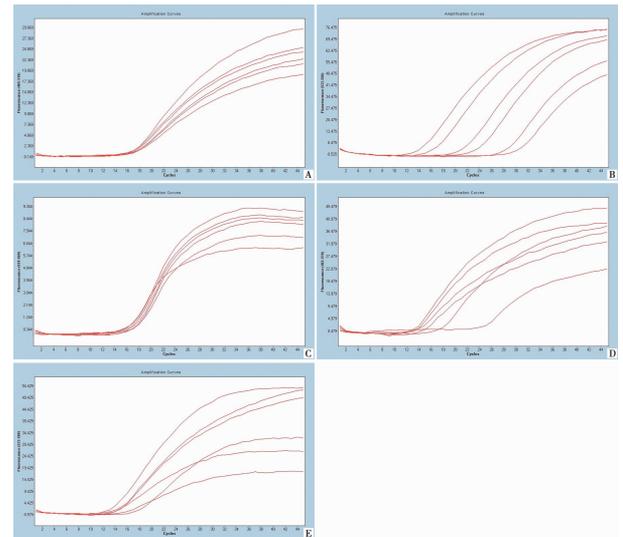
图2 多重qPCR检测5种致病菌的特异性实验

A *P. aeruginosa* B *E. Cloacae* C *E. coli* D *S. aureus*
E *S. epidermidis*

Fig. 2 Specificity of multiplex qPCR assays for five pathogenic bacteria

表4 5种致病菌标准质粒的线性方程
Table 4 Linear equation of standard plasmids of 5 pathogenic bacteria

名称 Name	斜率 Slope	相关系数 Correlation coefficient	截距 Intercept
金黄色葡萄球菌(<i>S. aureus</i>)	3.180	0.997	32.68
表皮葡萄球菌(<i>S. epidermidis</i>)	3.320	0.990	36.32
大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)	3.030	0.998	33.64
铜绿假单胞菌(<i>P. aeruginosa</i>)	3.230	0.998	37.64
阴沟杆菌(<i>E. cloacae</i>)	3.380	0.999	39.02

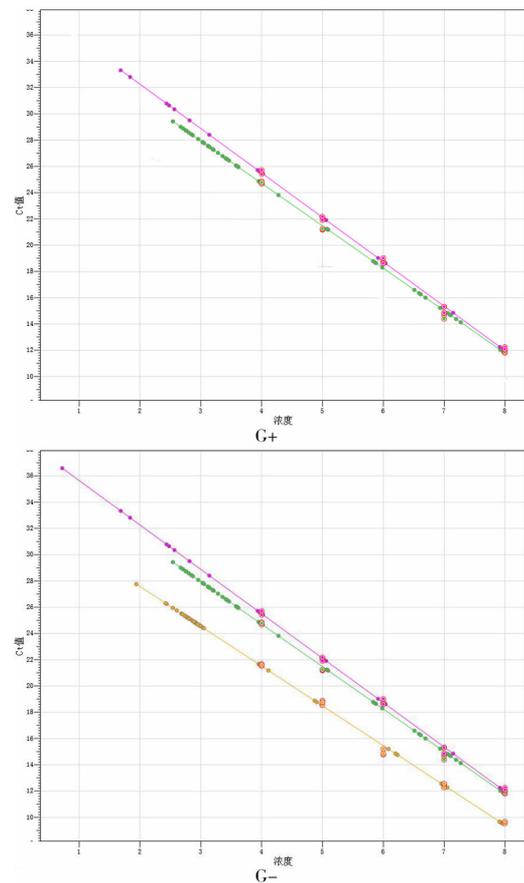


A 铜绿假单胞菌 B 阴沟杆菌 C 大肠埃希菌 D 金黄色葡萄球菌 E 表皮葡萄球菌

图3 多重qPCR检测5种致病菌的敏感性实验

A *P. aeruginosa* B *E. Cloacae* C *E. coli* D *S. aureus*
E *S. epidermidis*

Fig. 3 Sensitivity of multiplex qPCR assays for five pathogenic bacteria



A 表皮葡萄球菌 B 金黄色葡萄球菌 C 阴沟杆菌 D 铜绿假单胞菌 E 大肠埃希菌

图4 五种致病菌多重qPCR检测方法的线性关系

A *S. epidermidis* B *S. aureus* C *E. Cloacae* D *P. aeruginosa* E *E. coli*

Fig. 4 Linearity of multiplex qPCR assays for five pathogenic bacteria

表5 临床组织检测结果
Table 5 Clinical tissue test results

取材部位 Location	植入物 Implant	脓 Purulence	窦管 Sinus tract	组织培养结果 Tissue culture	多重 qPCR 结果 Multiplex qPCR
胫骨	钢板	是	是	普雷沃氏菌	阴沟肠杆菌, 大肠埃希菌
股骨	髓内钉	否	否	大芬戈尔德菌	—
尺骨	钢板/螺钉	否	否	—	—
踝关节	钢板/螺钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 阴沟肠杆菌, 大肠埃希菌
胫骨	钢板/螺钉	是	是	痤疮丙酸杆菌	—
胫骨	钢板/螺钉	否	否	阴沟肠杆菌	阴沟肠杆菌
股骨	髓内钉	是	否	阴沟肠杆菌	阴沟肠杆菌
肱骨	钢板/螺钉	否	是	产气肠杆菌	—
股骨	钢板/螺钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
踝关节	钢板/螺钉	是	是	荧光假单胞菌	—
胫骨	钢板/螺钉	是	否	黄曲霉菌	大肠埃希菌
锁骨	钢板/螺钉	是	否	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌, 大肠埃希菌
股骨	髓内钉	否	否	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
尺骨	钢板/螺钉	是	是	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
跟骨	钢板/螺钉	是	是	大肠埃希菌	大肠埃希菌
股骨	钢板/螺钉	否	否	大肠埃希菌	大肠埃希菌, 铜绿假单胞菌
股骨	髓内钉	是	是	大肠埃希菌	大肠埃希菌
指骨	钢板/螺钉	是	是	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
胫骨	髓内钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌, 大肠埃希菌
股骨	钢板/螺钉	是	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌
股骨	髓内钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌
胫骨	钢板/螺钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 阴沟肠杆菌
踝关节	钢板/螺钉	否	否	大肠埃希菌	大肠埃希菌, 阴沟肠杆菌
股骨	钢板/螺钉	否	是	大肠埃希菌	大肠埃希菌
胫骨	钢板/螺钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
肱骨	钢板/螺钉	否	否	大肠埃希菌	大肠埃希菌, 金黄色葡萄球菌
指骨	钢板/螺钉	是	是	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
尺骨	钢板/螺钉	是	是	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
胫骨	钢板/螺钉	否	否	脆弱拟球菌	铜绿假单胞菌
股骨	钢板/螺钉	否	否	阴沟肠杆菌	—
胫骨	钢板/螺钉	是	是	大肠埃希菌	大肠埃希菌
股骨	髓内钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌, 阴沟肠杆菌
股骨	空心钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
胫骨	钢板/螺钉	否	否	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌
股骨	髓内钉	是	否	阴沟肠杆菌	大肠埃希菌
踝关节	钢板/螺钉	是	是	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌, 大肠埃希菌
股骨	钢板/螺钉	否	否	爪甲白癣菌	—
指骨	钢板/螺钉	是	是	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌, 大肠埃希菌
股骨	髓内钉	否	否	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌
掌骨	钢板/螺钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
跟骨	钢板/螺钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌
胫骨	钢板/螺钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
胫骨	钢板/螺钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌
股骨	髓内钉	否	否	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
股骨	钢板/螺钉	否	否	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌, 铜绿假单胞菌
股骨	钢板/螺钉	否	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌, 大肠埃希菌
跟骨	钢板/螺钉	是	是	肺炎克氏菌	金黄色葡萄球菌
跟骨	钢板/螺钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
股骨	髓内钉	是	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌
跟骨	钢板/螺钉	是	是	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌
跖骨	钢板/螺钉	是	是	大肠埃希菌	大肠埃希菌, 铜绿假单胞菌
掌骨	钢板/螺钉	是	是	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
股骨	髓内钉	是	否	弗氏链霉菌	铜绿假单胞菌
股骨	髓内钉	是	否	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌
胫骨	钢板/螺钉	是	是	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌
跟骨	钢板/螺钉	是	是	阴沟肠杆菌	—
掌骨	钢板/螺钉	否	否	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌
股骨	钢板/螺钉	否	否	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌
踝关节	钢板	是	是	液化沙雷氏菌	大肠埃希菌
腰背部	螺钉	是	否	大肠埃希菌	大肠埃希菌
腰背部	螺钉	是	否	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
腰背部	螺钉	是	否	鲁氏不动杆菌	大肠埃希菌
股骨	螺钉	是	否	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
小腿	钢板	是	否	—	—
小腿	钢板	是	否	—	—
股骨	螺钉	否	是	阴沟肠杆菌	阴沟肠杆菌

注: 粗体字表示两种检测菌株不同; “—”表示未检测到。

4 临床样品检测结果

24 例未感染的阴性对照组样本中,组织培养法有 3 例(12.5%)结果显示阳性,多重 qPCR 法有 4 例(16.7%)结果显示为阳性。在 66 个 FRI 病例中,组织培养法在 3~7 d 鉴定出 63 例(95.5%)病原体,而多重 qPCR 法在 5 h 内鉴定出 56 例(84.8%)病原体(表 5)。有 2 例样品(表 5,粗体字)通过组织培养法和多重 qPCR 法,得到的结果不同,而在剩余 2 例样品中,多重 qPCR 法未能检测到菌种感染,而组织培养结

果显示存在有阴沟肠杆菌感染(表 6)。多重 qPCR 的敏感性和特异性分别为 93.3%和 66.7%,组织培养的敏感性分别为 95.4%和 87.5%(表 7)。如果比较检测范围内的病例,特别是 5 种常见病原体,多重 qPCR 的特异性从 66.7%变化到 90.9%(表 7)。与组织培养法(AUC=0.88;95% CI,0.67-0.96)相比,多重 qPCR 显示的 ROC 曲线下面积相对较小(AUC=0.73;95% CI,0.46-0.80)($P<0.01$)(图 5)。

表 6 所有病例的组织培养和多重 qPCR 检测表现
Table 6 Detective performance of tissue culture and multiplex qPCR in all cases

试验 Test	准确性 Accuracy(%)	敏感性 Sensitivity(%)	特异性 Specificity(%)	NPVnegative predictive Value(%)	PPV positive predictivevalue(%)	AUCarea under the ROC curve	Youden 指数 Youden Index
组织培养法	93.3	95.4	87.5	87.5	95.4	0.88	0.83
多重 qPCR	84.4	93.3	66.7	83.3	84.8	0.73	0.68

注:NPV,阴性预测值;PPV,阳性预测值;AUC,曲线下面积;PCR,聚合酶链式反应。

表 7 常见病原菌感染的组织培养和多重 qPCR 检测
Table 7 Detective performance of tissue culture and multiplex qPCR in infected by common pathogens

试验 Test	准确性 Accuracy(%)	敏感性 Sensitivity(%)	特异性 Specificity(%)	NPVnegative predictive Value(%)	PPV positive predictivevalue(%)	Youden 指数 Youden Index
组织培养法	96.0	94.4	100.0	87.5	100.0	0.94
多重 qPCR	92.0	92.5	90.9	83.3	96.1	0.83

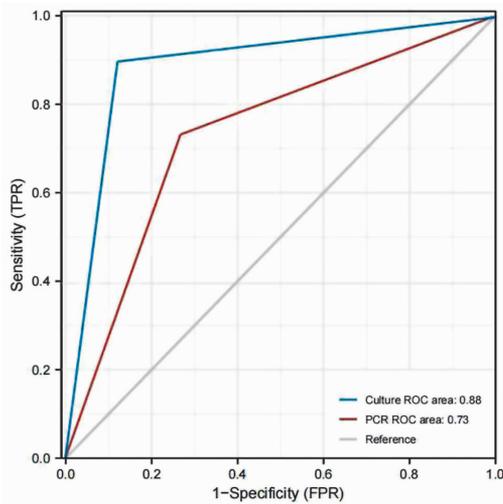


图 5 组织培养法和多重 qPCR 法检 FRI 特异性和敏感性的 ROC 曲线
Fig. 5 Receiver operating characteristic (ROC) curves of the specificity and sensitivity of tissue cultures and multiplex qPCR for diagnosing of all fracture-related infection.

讨论

目前临床诊断 FRI 感染的方法主要是细菌分离培养鉴定和血清学检测。分离培养法被认为是 FRI 临床诊断的“金标准”。但由于培养法耗时长、且抗生素的滥用导致送检样本阳性检出率低、以及菌体变异和耐药性的增加,使常规鉴定不易得到确定结果,难以与典型菌种完全对应。血清学检测虽然操作简便,但容易出现假阳性和假阴性结果,并且存在窗口期漏检,使

得感染早期难以确诊^[18]。与传统组织培养的检验方法相比,定量 PCR 在检测病原菌感染方面具有较强的优势^[19-21]。目前该技术已广泛应用于幽门螺旋杆菌、结核杆菌及支原体、衣原体等多种病原微生物的检测^[22-23]。Schmalz 等^[23]研究表明与普通 PCR 相比,荧光定量 PCR 检测的灵敏度通常可高出 2~3 个数量级。多重荧光定量 PCR 方法可在一个管中一次性检测多种病原菌,同时保持较高的灵敏性和特异性,不易造成交叉污染^[24],且整个过程仅需 1~2 h。

本研究中多重 qPCR 检测出的阳性结果为 84.8%,而组织培养检测出的阳性结果为 95.5%。在 63 例阳性培养标本中,5 种常见的致病菌占 81%,在这 51 例常见致病菌感染的病例中,多重 qPCR 在 5 h 检测出了 25(49%)例与组织培养法相一致的结果。在 26 例结果不一致的病例中,有 22 例多重 qPCR 结果显示为多重菌感染,而对应组织培养结果则为单一菌株感染。根据后续的鉴定和抗生素治疗的结果,可以确认在相应患者中感染性细菌。在 92.2%(47/51)的病例中,多重 qPCR 的结果与组织培养的结果一致或更好。

比较所有病例中组织培养法和多重 qPCR 的敏感性、特异性和 ROC 曲线发现组织培养检测 FRI 的性能略优于多重 qPCR。造成这种差异的可能原因是多重 qPCR 的引物设计。在这项研究中,设计的引物和探针只针对 5 种常见的病原体(如金黄色葡萄球菌、大

肠埃希菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌和阴沟杆菌), 而无法检测它们之外的菌株。这就造成了有限的监测范围, 并致使特异性和敏感性的检测效率较低。考虑5种常见致病菌株感染的病例, 多重 qPCR 的特异性从 66.7% 提升为 90.9%。

在常见致病菌感染中, 有 2 例样本多重 qPCR 方法没有检测到结果。可能的原因是由于生物膜形成导致的, 生物膜的形成在 FRI 的发病机制中至关重要^[25]。当生物膜形成时, 骨折感染很难被检测到^[26]。此外, 有 2 例样品通过组织培养法和多重 qPCR 法, 得到的结果不同。多重 qPCR 法可在 5 h 内提供结果。改进引物设置, 对额外菌种的引物设置, 可以提高多重 qPCR 的检测性能。

本研究利用金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因(166 bp)、表皮葡萄球菌 16S 基因(179 bp)、大肠埃希菌 ECs104 (272 bp)、铜绿假单胞菌外毒素 A 基因(151 bp)、阴沟杆 *ompX* 基因(196 bp) 的特异性片段, 设计引物和 TaqMan 探针, 建立了多重 qPCR 检测方法。该多重 qPCR 扩增结果与 DNA 浓度呈现良好的线性关系, 且具有良好的诊断价值。本研究结果表明, 基于 TaqMan 探针的多重 qPCR 检测具有准确定量、快速、简单和可重复的优点, 可用于多重细菌感染检测。

【参考文献】

[1] Metsemakers WJ, Morgenstern M, McNally MA, et al. Fracture-related infection: A consensus on definition from an international expert group[J]. *Injury*, 2018, 49(3): 505-510.

[2] Metsemakers WJ, Kuehl R, Moriarty TF, et al. Infection after fracture fixation; Current surgical and microbiological concepts [J]. *Injury*, 2018, 49(3): 511-522.

[3] Morgenstern M, Khl R, Eckardt H, et al. Diagnostic challenges and future perspectives in fracture-related infection[J]. *Injury*, 2018(49): 83-90.

[4] Zalavras CG, Marcus RE, Levin LS, et al. Management of open fractures and subsequent complications[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(4): 884-895.

[5] Kuehl R, Tschudin-Sutter S, Morgenstern M, et al. Time-dependent differences in management and microbiology of orthopaedic internal fixation-associated infections: an observational prospective study with 229 patients [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(1): 76-81.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S22, Wayne PA: CLSI, 2012.

[7] 陈倩倩, 宋缘缘, 唐洪影, 等. 2015-2018 年血流感染病原菌菌群分布及耐药性分析[J]. *天津医科大学学报*, 2020, 26(3): 271-275.

[8] Govaert GAM, Kuehl R, Atkins BL, et al. Fracture-Related Infection (FRI) Consensus Group. Diagnosing Fracture-Related Infection: Current concepts and recommendations[J]. *J Orthop Trauma*, 2020, 34(1): 8-17.

[9] Metsemakers WJ, Morgenstern M, Senneville E, et al. Fracture-

Related Infection (FRI) group. General treatment principles for fracture-related infection: recommendations from an international expert group[J]. *Arch Orthop Trauma Su*, 2020, 140(8): 1013-1027.

[10] Obremsky WT, Metsemakers WJ, Schlatterer DR, et al. Musculoskeletal infection in orthopaedic trauma: Assessment of the 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2020, 102(10): e44.

[11] Ma X, Han S, Ma J, et al. Epidemiology, microbiology and therapeutic consequences of chronic osteomyelitis in northern China: A retrospective analysis of 255 Patients[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14895.

[12] Metsemakers WJ, Smeets B, Nijs S, et al. Infection after fracture fixation of the tibia: Analysis of healthcare utilization and related costs[J]. *Injury*, 2017, 48(6): 1204-1210.

[13] Bassler HA, Flood SJA, Livak KL, et al. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of listeria monocytogenes[J]. *Appl Environ Microb*, 1995, 61(10): 3724-3728.

[14] Lyon WJ. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholera* O1, O139, non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater[J]. *Appl Environ Microb*, 2001, 67(10): 4685-4693.

[15] Kumar A, Asthana M, Gupta P, et al. 16SrRNA sequencing of Dye decolorizing bacteria isolated from Soil [J]. *Bioinformatics*, 2015, 11(1): 1-5.

[16] Bubba L, Pellegrinelli L, Pariani E, et al. A novel multiplex one-step real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification of enterovirus and parechovirus in clinical fecal samples[J]. *J Prev Med Hyg*, 2015, 56(2): 57-60.

[17] Xu Y, Larsen LH, Lorenzen J, et al. Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections[J]. *APMIS*, 2017, 125(4): 289-303.

[18] 王然, 刘雨, 于津伟, 等. 多重荧光定量 PCR 快速检测 6 种常见下呼吸道感染病原菌[J]. *天津医科大学学报*, 2021, 27(3): 285-290.

[19] 靳贵英. 药用辅料 β -环糊精中 7 种重金属元素的分析[J]. *今日药学*, 2017, 27(4): 228-231.

[20] García-Arieta A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014(65): 89-97.

[21] 彭亚柏, 朱秀云, 刘赛云, 等. 不同基因型 HCV 感染患者重叠 HBV 或 HIV 感染的病毒学特征[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(07): 861-863, 886.

[22] 向蕾, 陈仕菊, 王昕, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 快速检测四种呼吸道病毒的研究[J]. *热带医学杂志*, 2014, 14(4): 461-465.

[23] Schmalz G, Tsigaras S, Rinke S, et al. Detection of five potentially periodontal pathogenic bacteria in periimplant disease: A comparison of PCR and real-time PCR[J]. *Diagn Microb Infect Dis*, 2016, 85(3): 289 - 294.

[24] Welti M, Jatton K, Altwegg M, et al. Development of a multiplex realtime quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Le-gionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003, 45(2): 85-95.

[25] Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections [J]. *APMIS*, 2017, 125(4): 353-364.

[26] Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1771-1776.

【收稿日期】 2022-06-19 【修回日期】 2022-09-02